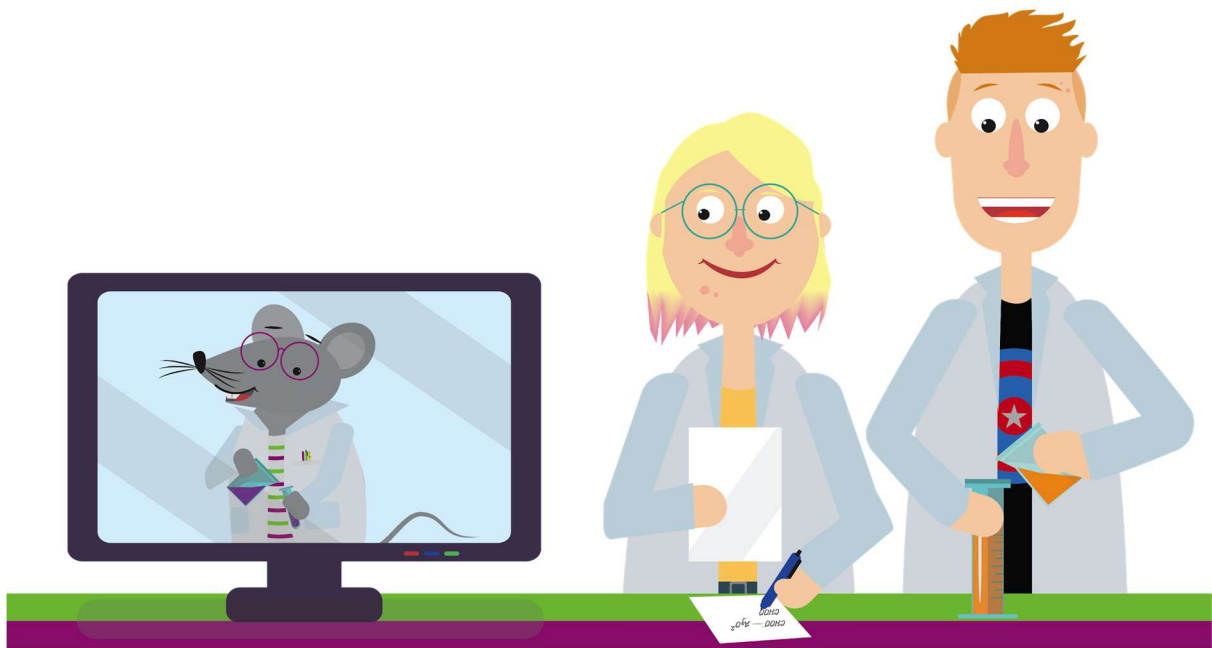


# GFP – świecące białko



Wspierają nas:



MIASTO  
STOŁECZNE  
WARSZAWA



Festiwal  
**nauki**  
WARSZAWA



Studenckie Koło  
Biofizyki Molekularnej

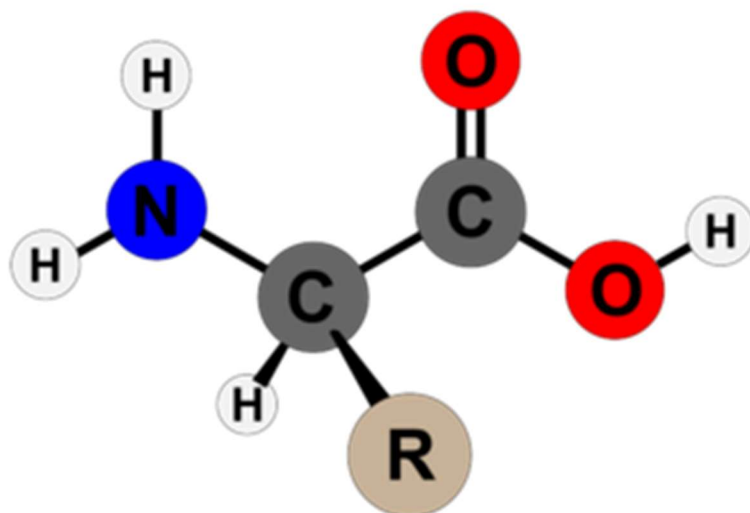
Od czego zacząć tę opowieść? Najlepiej od początku.

Wszystkie organizmy zbudowane są z komórek. Te zaś są zlepkiem organelli i cytoplazmy, a one z kolei zbudowane są ze związków chemicznych. Poza grupką związków nieorganicznych typu woda, kationy metali, aniony fosforanowe czy tlen i dwutlenek węgla, komórka zbudowana jest z czterech głównych składników. Są to:

- a) Cukry, pełniące głównie rolę magazynującą oraz strukturalną i oczywiście wykorzystywane są do produkcji energii.
- b) Lipidy – znów głównie związki magazynujące, energetyczne i budulcowe.
- c) Kwasy nukleinowe – to już ciekawsza grupa. Głównie odpowiadają za przechowywanie oraz przekazywanie informacji genetycznej, pozwalają na jej odczytanie, a niekiedy pełnią funkcje regulatorowe czy katalityczne.
- d) Białka – grupa najciekawsza funkcjonalnie i strukturalnie. Pełnią funkcje od budulcowych i katalitycznych, przez motoryczne, transportujące i magazynujące, aż po odpornościowe. Niektóre potrafią też świecić. Przykładem jest białko zielonej fluorescencji (ang. *Green Fluorescence Protein* GFP).

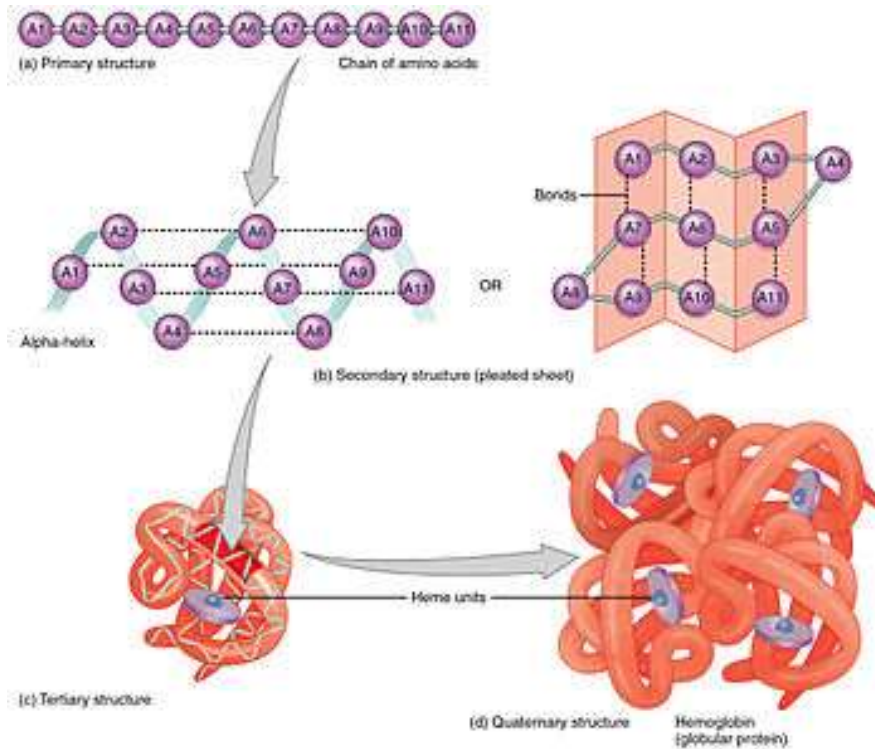
### Co musicie wiedzieć o białkach

Białka zbudowane są z cząsteczek, które nazywamy aminokwasami (Rysunek.1). Istnieją setki aminokwasów, jednak natura „upodobała sobie” dwudziestkę  $\alpha$ -aminokwasów. To, co odróżnia aminokwasy od siebie to tzw. reszta boczna (reszta aminokwasowa/łańcuch boczny), która nadaje danej molekułe jej unikalne właściwości. Grupy boczne możemy podzielić na kilka rodzajów: hydrofobowe, hydrofilowe, aromatyczne, naładowane itp. Kompozycja aminokwasowa białka jest kluczowa do tego, by mogło ono prawidłowo pełnić swoją funkcję, o czym później.



*Rysunek 1. Wizualizacja aminokwasu. Na środku schematu został przedstawiony węgiel  $\alpha$ , do którego przyłączone są: grupa aminowa, wodór, grupa karboksylowa i grupa boczna oznaczona literą „R” (np. R:  $-H$ ,  $-CH_2$ ,  $-C_6H_5$  itp.). O tym, z jakim aminokwasem mamy do czynienia decyduje reszta aminokwasowa R, która nadaje mu charakterystyczne właściwości, @Wikipedia commons*

Białka tworzone są poprzez przepisanie powstającego na podstawie odpowiedniego fragmentu DNA, mRNA na łańcuch aminokwasów. Za realizację tego procesu odpowiadają rybosomy. Grupy: aminowa i karboksylowa odpowiadają za tworzenie wiązania peptydowego, czyli wiązania łączącego aminokwasy, które w ten sposób tworzą łańcuch nazywany łańcuchem polipeptydowym (powstaje białko). Połączone ze sobą w określonej kolejności aminokwasy danego białka nazywamy strukturą I-rzędową. Następnie w obrębie łańcucha głównego białka powstają wiązania wodorowe, co skutkuje zwijaniem struktury I-rzędu do struktury II-rzędowej do formy  $\alpha$ -helisy lub  $\beta$ -kartki. Tak jak wcześniej napisałem, reszty boczne aminokwasów różnią się właściwościami. Jak doskonale wiadomo obiekty hydrofobowe „nie lubią” kontaktu z wodą. W przypadku hydrofobowych łańcuchów bocznych aminokwasów będą się one „chowaty” do środka powstającego białka, a hydrofilowe na zewnątrz. Białko zwija się tak długo, aż uzyska kształt minimalizujący kontakty reszt bocznych aminokwasów z wodą (niektóre wciąż ten kontakt będą miały) i maksymalizujący te kontakty dla reszt hydrofilowych. W ten sposób powstają przestrzenne relacje motywów II-rzędowych i białko formuje strukturę III-rzędu. W przypadku, w którym białko nie jest monomerem i zbudowane jest z kilku podjednostek, czyli kilku łańcuchów polipeptydowych, dochodzi do składania takiej kilku podjednostkowej molekuly, w wyniku czego powstaje struktura IV-rzędowa. Po tym procesie białko uzyskuje odpowiedni kształt i może pełnić swoją funkcję.



**Rysunek.2. Schematyczne przedstawienie struktur rzędowych białek.** Na schemacie przedstawione są struktury I, II, III i IV-rzędu na przykładzie hemoglobiny. Jak widzimy przejście ze struktury I-rzędu oznacza tworzenie przestrzennych relacji między strukturami II, a potem III-rzędu. @Wikipedia commons

### Kształt ma znaczenie

W trakcie nauki na temat białek czy to na poziomie liceum, czy studiów podkreśla się istnienie rzędowości struktur białek, tego, że muszą mieć prawidłowy kształt, a błąd w jego przyjmowaniu może skutkować degradacją białka albo zagrożeniem dla komórki. Pytanie jest takie: dlaczego kształt białka jest tak silnie związany z jego prawidłowym działaniem?

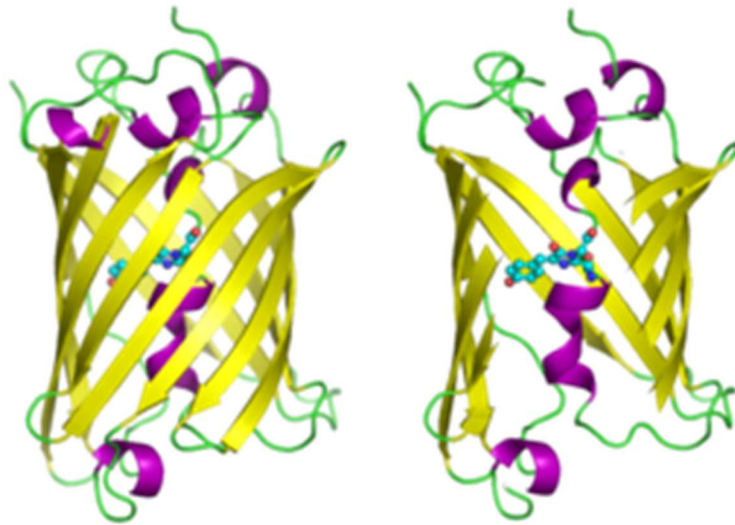
Co odróżnia od siebie łyżkę i widelec powodując, że ta pierwsza świetnie się nadaje do jedzenia zupy? Oba te przedmioty zrobione są z dokładnie tego samego materiału, mają nawet podobny, dwuczęściowy plan budowy i w miarę zbliżone funkcje. Jest jednak między nimi pewna subtelna różnica, która w pełni warunkuje ich przeznaczenie, a w niektórych kręgach ich pomylenie uchodzi za jedno z większych przewinień. Tą różnicą jest właśnie kształt, a dokładniej kształt (konformacja) końcówki danego sztucца. Jeśli teraz się zastanowić, dlaczego kubek dobrze nadaje się do przechowywania herbaty, a krzesło do siedzenia, to znów okaże się, że jest to wynik kształtu. Jest to w pełni

oczywiste, jednak na co dzień nie zwracamy na takie rzeczy uwagi. Konformacja danego białka, tak jak kształt sztucca czy mebla, w pełni warunkuje jego funkcję. Przykładem jest moment, w którym białko ulega jakiejś modyfikacji, np. fosforylacji, która powoduje zmianę jego konformacji i może powodować „wyłączenie” danej molekuly.

Spójrzmy teraz na konkretny przykład, który zaprowadzi nas bezpośrednio do białka, o którym chcę szerzej napisać. Popatrzmy na lampę, latarkę czy reflektor w samochodzie i pomyślmy o ich konstrukcji. Ogólna architektura jest taka sama: w środku element świecący, a na zewnątrz obudowa chroniąca ten element. Można pomyśleć, że wymyślenie takiej struktury było aktem geniuszu człowieka, a w naturze na pewno nie występują latarnie. Nic bardziej mylnego! Czy wiecie, że istnieją świecące meduzy?! *Aequorea victoria* to gatunek meduz zdolnych do syntezy tzw. białka GFP (ang. *Green Fluorescent Protein*). Najprawdopodobniej białko to odpowiada za transfer energii emitowanego przez akworynę - inne świecące białko - niebieskiego światła i późniejszą emisję światła zielonego przez GFP. Można pomyśleć, że świecące białko, to ewenement sam w sobie, jednak okazuje się, że jego struktura jest niemniej wyjątkowa niż jego funkcja. Dla mnie była ogromnym zaskoczeniem.

### Naturalna latarnia

Białko GFP zbudowane jest z jedenastu  $\beta$ -nici budujących razem jedną dużą  $\beta$ -kartkę, która zwija się do zamkniętej struktury w kształcie beczki. Nazywamy ją  $\beta$ -beczułką. W środku tej struktury znajdują się trzy aminokwasy: seryna (65), tyrozyna (66) i glicyna (67), które podlegają modyfikacjom i tworzą specyficzną strukturę tripeptydu o odmiennej (od pojedynczych aminokwasów) aranżacji elektronów, który przez zdolność do świecenia nazywany jest fluoroforem. To inne ułożenie elektronów powoduje, że te trzy aminokwasy mogą absorbować światło w zakresie barwy fioletowej i niebieskiej (395 i 475nm) oraz emitować fotony o długości fali odpowiadającej barwie zielonej (508nm).



**Rysunek.3. Wizualizacja białka GFP.** Po lewej widzimy pełną strukturę  $\beta$ -beczułki, która zabezpiecza trzy aminokwasy (widoczne po prawej) tworzące fluorofor. Jak się okazuje struktura  $\beta$ -beczułki jest kluczowa dla prawidłowego działania fluoroforu, ze względu na to, że zauważono, że w przypadku uszkodzenia tej struktury, białko traci możliwość świecenia. @Wikipedia commons

Można spojrzeć na to tak:  $\beta$ -beczułka stanowi formę obudowy/klosza, a fluorofor elementu świecącego. Wobec tego białko GFP spełnia wymogi każdego przyzwoitego obiektu, który świeci! Widzimy, że molekularna latarnia ma kształt dobrze nam znanej latarni. Jest to piękny przykład jak funkcja i struktura (kształt) obiektu są ze sobą nierozdzielnie powiązane.



**Rysunek.4. Fluorofor białka GFP.** Fluorofor białka GFP formują trzy aminokwasy: seryna (65), tyrozyna (66) i glicyna (67), które podlegają autocyklizacji czego efektem jest nabycie zdolności do absorbowania i promieniowania świetlnego z zakresu widzialnego. @Wikipedia commons

Gdy myślimy o białku GFP i prowadzeniu nad nim badań, powinniśmy zadać sobie pytanie: czy poza zwykłą informacją: „białko, które świeci” czerpiemy z tej wiedzy jakieś korzyści?





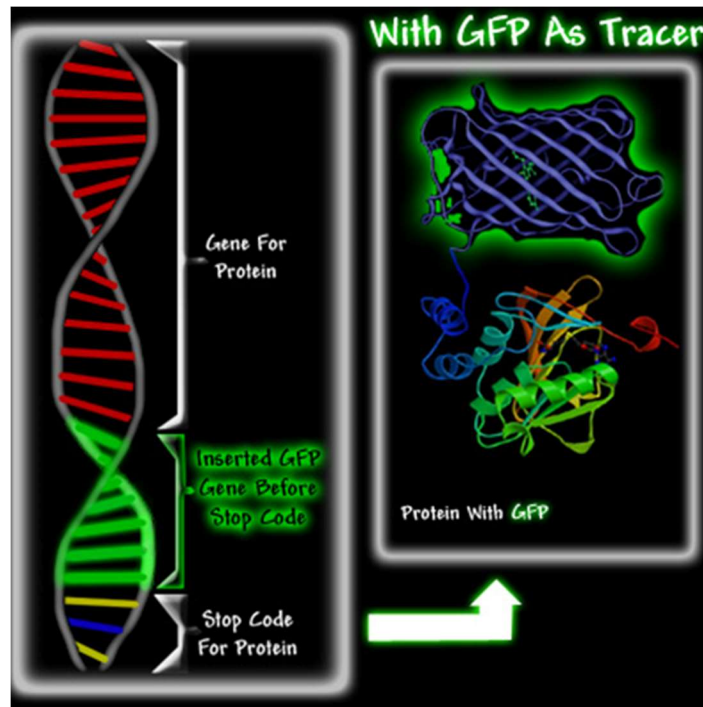
Okazuje się, że tak. Znane są w naturze inne zjawiska bioluminescencji, np. lucyferaza katalizuje reakcję, której działanie wykorzystują do świecenia świetliki. Jednak w tym przypadku mamy do czynienia z enzymem, który wymaga obecności odpowiedniego substratu. Dla białka GFP sytuacja wygląda inaczej. Do jego świecenia wystarczy zbombardowanie go światłem o odpowiedniej długości fali. Ta właściwość spowodowała, że białko to znalazło szereg zastosowań w nauce.

### Po co komu świecące białko?

Białko GFP ma wiele zastosowań w nauce i edukacji. Oto kilka z nich:

- a) Białko modelowe do badania procesu zwijania – po biosyntezie na rybosomie białka muszą zwinąć się do odpowiedniej struktury, żeby prawidłowo pełnić swoją funkcję, ale to już wiemy. Różnego typu problemy w trakcie tego procesu czy jego zaburzenia mogą prowadzić do powstawania molekuł o nieprawidłowym kształcie, które nie będą pełniły swojej funkcji, a może nawet będą szkodliwe lub wręcz toksyczne dla komórki. Z tego powodu lepsze zrozumienie samego procesu zwijania jest niezbędne. Problem może stanowić to, że niemożliwe jest uzyskanie próbki niezwinętego białka. Białko GFP po denaturacji (zniszczeniu struktury) jest zdolne do renaturacji, czyli ponownego zwinienia. Możliwe jest wobec tego jego denaturowanie, a następnie obserwacja ponownego zwijania, co omija problem braku niezwinionych molekuł.
- b) Wykorzystanie GFP do badania lokalizacji innych białek – wyobraźmy sobie, że odkrywamy nowy gen i chcemy określić, gdzie znajduje się produkowane, na jego podstawie, białko. Można stworzyć białko fuzyjne, czyli połączenie białka z nowo odkrytego genu (które będę nazywał „X”) z GFP. Po wyprodukowaniu w komórce białka X jest ono transportowane do swojego miejsca przeznaczenia. Dzięki fuzji z GFP wystarczy wywołać fluorescencję (mikroskopia fluorescencyjna). W jej wyniku zostanie zaobserwowane świecenie np. cytoplazmy, mitochondrium, jądra komórkowego itp. Na podstawie takiej informacji można wstępnie określić funkcję lub metodykę dalszego badania białka X, bo znamy jego miejsce w komórce.



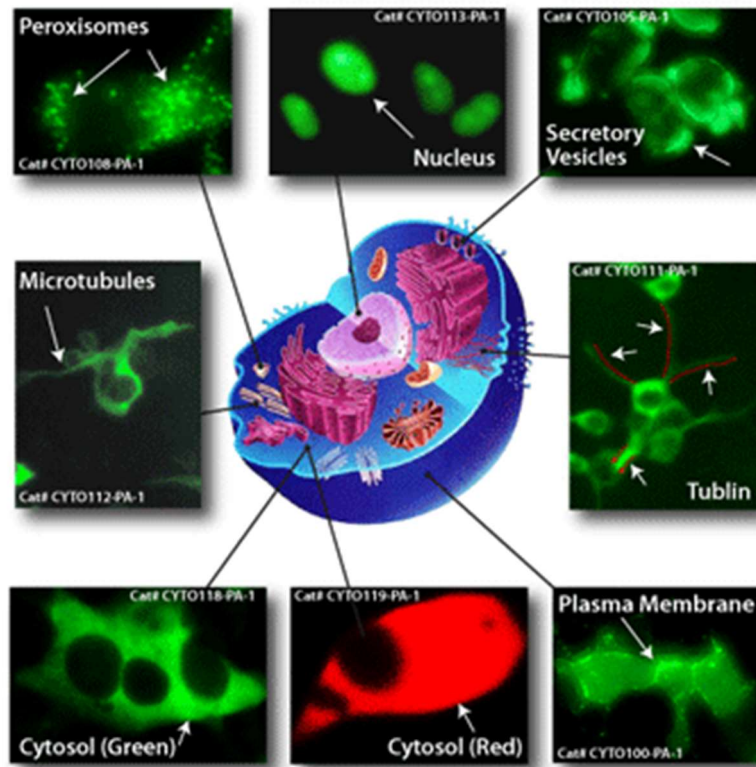


**Rysunek.5. Białko fuzyjne z GFP.** Graficzne przedstawienie sposobu opracowania białka fuzyjnego: badane białko + białko GFP. Dzięki temu możliwe jest fluorescencyjne wyznakowanie białka i obserwacja jego losów w komórce. @Wikipedia commons

- c) Obserwacje w czasie rzeczywistym – skoro możemy połączyć interesujące nas białko z GFP, to przy pomocy mikroskopii fluorescencyjnej możemy obserwować komórki w czasie rzeczywistym badając transport poszczególnych molekuł.
- d) GFP jako gen reporterowy – a może chcemy zbadać regulację danego genu lub poszukujemy związku, który by na nią wpływał? Możemy oczywiście badać aktywność danego genu poprzez sprawdzanie poziomu RNA lub danego białka w komórce, jednak takie metody są skomplikowane, czasochłonne i kosztowne. Można jednak połączyć badany gen z genem kodującym GFP, a wtedy jego ekspresja będzie wykrywana poprzez pojawienie się w komórce sygnału fluorescencyjnego. Jeżeli teraz byśmy się skupili na poszukiwaniu np. inhibitorów ekspresji danego genu „Y” (np. interesuje nas wyłączenie jakiegoś genu w komórce nowotworowej), to możemy wyobrazić sobie dokładnie taki gen: „Y+GFP”. Jeżeli wyhodujemy komórki z takim genem, a następnie podzielimy hodowlę np. na 96 próbek i do każdej dodamy inny potencjalny inhibitor, w ten sposób sprawdzimy w jednym eksperymencie wpływ 96 różnych związków na ekspresję genu „Y”. Takie eksperymenty nazywamy „screeningiem” i jest to krok



- e) w kierunku badań wysoko przepustowych, które pozwalają na wykonywanie wielu eksperymentów naraz w bardzo krótkim czasie.



**Rysunek.6. Obrazowanie różnych elementów komórkowych z użyciem GFP.** Opracowywanie białek fuzyjnych GFP z białkami tworzącymi określone struktury komórkowe umożliwia ich obrazowanie. Dodatkowo, jeżeli chcemy badać nieznaną nam białko, to stworzenie takiej fuzji daje możliwość poznania miejsca, w którym ono przebywa po biosyntezie, co może sugerować jego funkcje, jak i potencjalne metody dalszego badania. Źródło: <https://www.biocat.com>

- f) Badanie stężenia związków chemicznych – przez lata badań nad GFP opracowano wiele mutacji tego białka. Naukowcy postanowili sprawdzić następującą rzecz: stworzyli białko fuzyjne, w którym do dwóch końców białka o nazwie kalmodulina zostały przyłączone dwa różne białka GFP (dwa różne mutanty). Układ był tak stworzony, że pierwsze GFP absorbowało promieniowanie świetlne i dzięki bliskiemu kontaktowi, przekazywało drugiemu pochodzącą z tego promieniowania energię. Następnie druga cząsteczka emitowała światło. Po co wobec tego przyłączono te białka do kalmoduliny? Kalmodulina jest białkiem zdolnym do wiązania jonów wapnia  $Ca^{2+}$ . Wiązanie jonów wapnia skutkuje zmianami konformacyjnymi w tym białku. W przypadku białka fuzyjnego „GFP1-

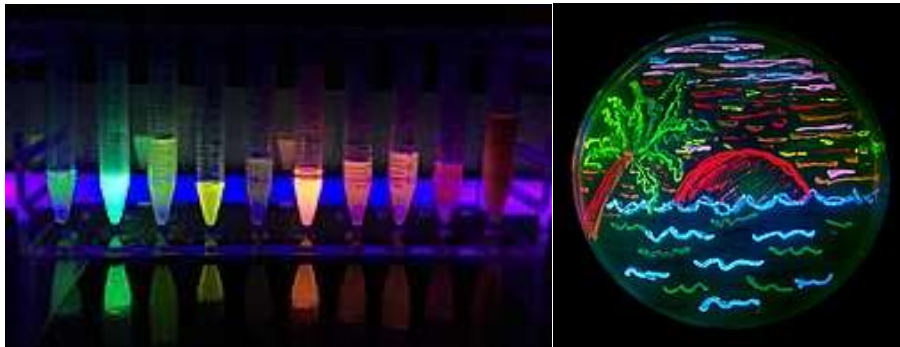


kalmodulina-GFP2” zmiana konformacyjna skutkuje oddaleniem cząsteczek obu form GFP, przez co niemożliwy jest przekaz energii, a w efekcie zanika fluorescencja. Wobec tego widzimy, że udało się stworzyć fluorescencyjny detektor stężenia jonów wapnia i jak się okazuje działa on nie tylko w warunkach *in vitro*, ale też *in vivo* w komórkach.

- g) Dydaktyka i popularyzacja nauki – świat nauki zna dziesiątki tysięcy białek. Jednak niewiele tak wdzięcznych obiektów do popularyzowania osiągnięć nauki szerszej publiczności, jak GFP. Popularyzacja nauki jest niezwykle ważna z punktu widzenia prowadzenia badań naukowych. Dzięki niej społeczeństwo, a więc też fundatorzy badań, mogą lepiej zrozumieć świat nauki i uzmysłowić sobie jej przełożenie na ich życie codzienne. Również w trakcie wydarzeń popularnonaukowych można zarazić naukową ciekawością kolejne pokolenia badaczy. Dzięki temu, że gołym okiem doskonale widzimy barwę białka GFP (większość roztworów białek jest przezroczysta), można opracowywać proste, ale też widowiskowe eksperymenty. Uczestnicy wydarzeń popularnonaukowych mogą denaturować GFP w podwyższonej temperaturze (obserwować „gołym okiem” spadek intensywności barwy próbki), a następnie wkładając do lodu renaturować (widząc wzrost intensywności koloru). Można badać działanie enzymów tnących białka na przykładzie trawienia GFP. Wykorzystuje się to białko do przedstawiania metod spektroskopowych badających absorpcję i emisję.
- h) Transgeniczne zwierzęta – w ostatnich latach pojawiły się też transgeniczne zwierzęta, które są zmodyfikowane w taki sposób, że produkują GFP we wszystkich komórkach organizmu. Takie organizmy tworzone są w celu opracowania modeli chorób, czyli zwierząt, które mogą wykształcić daną chorobę, a następnie możliwe jest testowanie na nich terapii. Opracowano również odmianę danio przegowanego produkującego GFP (GloFish) w celu wykrywania skażenia wody. Jak się okazuje, rynek nie jest ślepy na naukę. Została podjęta próba komercyjnego wykorzystania modyfikowanych, świecących zwierząt. Próbowano sprzedawać domowym hodowcom GloFish czy NeonMice, czyli myszy produkujące w swoich organizmach GFP. Nie komentuję tych zabiegów. Myślę, że to świetne zagadnienie do przeprowadzenia debaty bioetycznej np. w szkole na temat komercyjnego wykorzystania świecących zwierząt.



Tak jak pisałem, przez lata naukowcy tworzyli różne mutanty białka GFP. Planowano sprawdzić, czy możliwe jest uzyskanie innych barw fluorescencji. Zadanie to się powiodło, co fantastycznie obrazuje Rysunek.7. Poza tworzeniem ładnych obrazków tworzenie fluoryzujących na różne kolory mutantów GFP ma aplikacje w świecie eksperymentalnym. Wyobraźmy sobie, że mamy dwa białka X i Y i dręczy nas pytanie: czy w komórce spotykają się ze sobą i tworzą kompleksy? Weźmy teraz te białka i stwórzmy wersje fuzyjne: X-RGB (białko czerwonej fluorescencji) i Y-EBFP (niebieska fluorescencja). Jeżeli białka X i Y nie spotykają się w komórce, to zaobserwujemy w komórce dwa kolory: czerwony i niebieski. Natomiast jeżeli powstaje kompleks X-Y, to RGB i EBFP będą na tyle blisko siebie, że zaobserwujemy fluorescencję w kolorze fioletowym. Czyż to nie jest piękny eksperyment?



**Rysunek.7. Różnokolorowe mutanty białka GFP.** Po lewej widzimy wyizolowane mutanty białka, które wykazują się odmienną od dzikiego (niemutowanego) GFP fluorescencją. Po prawej „namalowano” obraz krajobraz plaży w San Diego przy użyciu ośmiu różnych szczepów bakterii, z których każdy syntetyzował inny mutant białka GFP. Obrazek powstał w celu zobrazowania możliwości, jakie przyniosła inżynieria genetyczna w zakresie wykorzystania tego białka. @Wikipedia commons

### Od świecących meduz do bioprojektowania

Ostatnie pytanie, jakie należy sobie zadać to, jaka jest przyszłość badań nad GFP? Naukowcy wskazują, że wymagane jest dalsze badanie GFP i jemu podobnych białek w innych organizmach, tworzenie platform do lepszego obrazowania próbek zawierających GFP oraz tworzenie układów już niepojedynczych typów komórek, a tkanek czy organów, które można by badać przy pomocy GFP i jego mutantów.

Wcześniej pisałem o tworzeniu ryb, które mogłyby wykrywać skażenie środowiska oraz o możliwości wykorzystania GFP w roli genu reporterowego. Pozwolę sobie na pewną fantazję naukową. W USA (to jest prawdziwa informacja) istnieje zespół badawczy zainteresowany możliwym wykorzystaniem organizmów w architekturze np. grzyby

mogłyby współbudować ściany. Wyobraźmy sobie teraz, że tak modyfikujemy te grzyby, że zaczynają produkować coś świeżącego... czyli na przykład GFP (!) w wyniku wykrycia związku „Z”. Co mogłoby być takim związkiem? Gaz używany w kuchenkach, tlenek węgla, a może nauka pójdzie jeszcze dalej i nawet spięcie w instalacji elektrycznej. Wobec tego, jeżeli dojdzie do uszkodzenia instalacji gazowej, to ściana w takim bio-budynku powinna zacząć świecić. Budynek mógłby sam nas informować nie tylko o zagrożeniu, ale też dokładnie nakierować nas na miejsce, które trzeba naprawić.

Ostatnie słowa chcę poświęcić naukowcom. Zazwyczaj, gdy pisze się o jakichś odkryciach, w pierwszej kolejności wymienia się tych, którzy daną rzecz opracowali czy wynaleźli. Wielu naukowców chciało badać białko GFP, jednak w czasach Zimnej Wojny niechętnie przeznaczano pieniądze na badanie przyczyn świecenia meduz. Przecież łądzi podwodnej nie wykryją! Kilku naukowców mimo braku konkretnego finansowania na swoje badania podjęło samodzielne próby rozwiązania zagadki świejących meduz i po latach odkryli właśnie białko GFP. Oczywiście po tym, jak się okazało, że można wykorzystać to białko do rozwoju biologii i medycyny pieniądze popłynęły nieco szerszym strumieniem. Za to odkrycie Roger Y. Tsien, Osamu Shimomura i Martin Chalfie zostali nagrodzeni w 2008 roku Nagrodą Nobla w dziedzinie chemii za „odkrycie i rozwój badań nad białkiem zielonej fluorescencji”. Morał? Bądźmy uparci i podążajmy za tym, co nas interesuje.

#### Źródła:

[1] Kumar, A. and D. Pal. "Green Fluorescent Protein and their Applications in Advance Research." (2016). [10.46565/jreas.2016.v01i01.007](https://doi.org/10.46565/jreas.2016.v01i01.007)

[2] Tsien, R. Y. (1998). *The Green Fluorescent Protein*. *Annual Review of Biochemistry*, 67(1), 509–544. [doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.509](https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.509)

[3] Misteli, T., & Spector, D. L. (1997). *Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology*. *Nature Biotechnology*, 15(10), 961–964. [doi:10.1038/nbt1097-961](https://doi.org/10.1038/nbt1097-961)

